

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学
博 士 后 研 究 工 作 报 告

高柠檬酸类似物的不对称合成

陈 洪 斌 博 士

合作导师：陈 忠 教 授

工作完成日期：2007.03-2009.03

报告提交日期： 2009.03

厦门大学

2009 年 3 月

高柠檬酸类似物的不对称合成

Asymmetric synthesis of the analogues of homocitric acid

博士后姓名：陈 洪 斌

流动站（一级学科）名称：物 理 学

专 业（二级学科）名称：无线电物理

研究工作起始时间：2007 年 3 月

研究工作期满时间：2009 年 3 月

厦 门 大 学

2009 年 3 月

厦门大学博士后研究工作报告著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（☒）， 2、不保密（☐）

纸本在 5 年解密后适用本授权书；

电子版在 5 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：陈洪斌 日期：2009 年 3 月 20 日

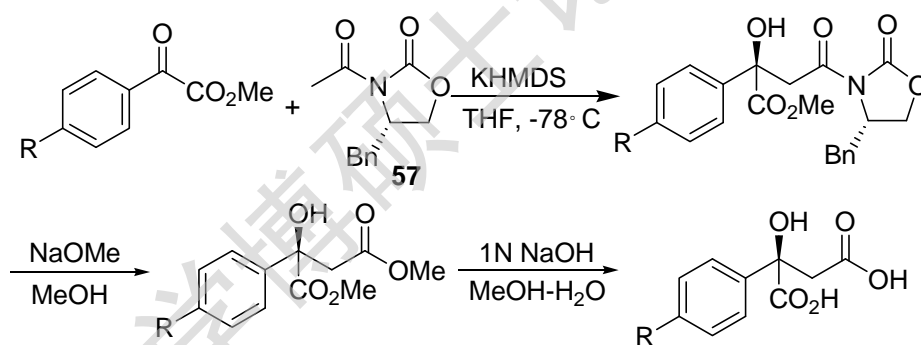
导师签名：陈 忠 日期：2009 年 3 月 20 日

摘要

固氮酶催化作用的分子机理一直是多学科研究的难点。虽然近二十年来有关固氮酶结构与功能之间关系的研究取得了很大的进展，但一些与酶促反应动态有关的关键问题，如氮分子与活性中心 FeMoco 配位的位置和与活化的方式、质子和电子在蛋白内的传递途径、酶促固氮为什么必须放氢等，至今仍存在很大的争议。

论文作者在博士研究生阶段提出了固氮酶存在两条以氢键链为传递途径的质子传递通道，并认为这两条质子传递通道在酶促反应中为氮分子进入活性中心 FeMoco 并被还原起到开门的作用。为了验证我们提出的这个假设，我们设计合成了外消旋高柠檬酸和超高柠檬酸作为分子探针，并采用离体配体取代的方法研究其生化特性。

在本出站报告中，我们主要介绍一下我们这两年在固氮酶机理研究方面的一部分工作，即合成特定的高柠檬酸类似物作为机理研究的分子探针 (**Scheme 1**)。



Scheme 1

反应的关键步骤是 (S)-4-苄基-3-乙酰基-2-噁唑烷酮 **57** 与不同取代基的 α -苯乙酮酸甲酯的Evans aldol反应。在合成过程中，我们使用六甲基二硅氨基钾 (KHMDS) 而不是价格昂贵的二丁基三氟甲磺酸硼酯 (Bu_2BOTf) 作为手性辅基 **57** 的烯醇化条件，反应的产率中等，立体选择性中等至良好。Aldol反应的产物通过甲醇钠去除手性辅基和氢氧化钠水解，即得到各种结构的高柠檬酸的类似物。

遗憾的是, Evans aldol 反应对于 α -氧代戊二酸二甲酯、 α -氧代己二酸二乙酯、苯丙酮酸甲酯类的底物并未取得成功。因此, 我们只能在后续工作中采用其它的合成办法。

毫无疑问, 这些高柠檬酸类似物的合成, 为我们研究高柠檬酸在酶促固氮反应中承担的功能以及揭示固氮酶催化作用的分子机理提供了非常重要的分子探针。

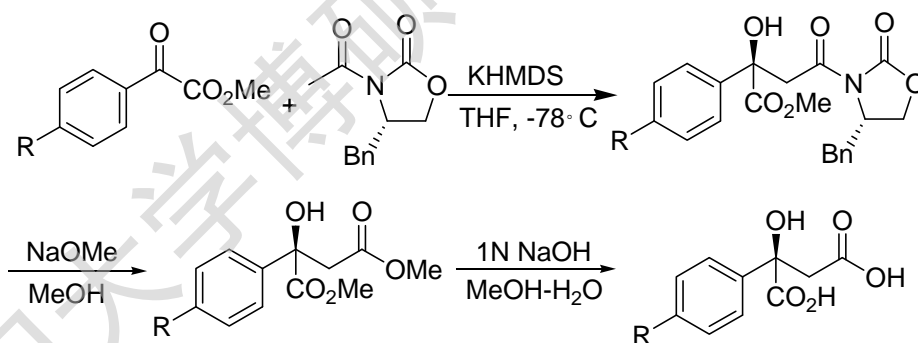
关键词: 固氮酶、高柠檬酸类似物、Evans aldol 反应, 不对称合成

Extended Abstract

The molecular mechanism of nitrogenase-catalyzed reactions is a challenging research topic in multi-disciplinary areas. Although great progress in the relationship between structure and function of nitrogenase have been achieved in the last two decades, certain critical problems, such as how N_2 coordinated and activated in FeMoco, how proton and electron transfer in the proteins, and why hydrogen evolution is obligatory during the reduction of N_2 catalyzed by nitrogenase, remain conversial to date.

In the doctorate thesis, the author had proposed that two hydrogen-bond wires exist in nitrogenase may function as proton-transfer pathways and these two pathways may serve as a gate to direct N_2 to enter the core of FeMoco and be reduced. To testify this proposal, racemic homocitrate and per-homocitrate were synthesized as functional molecular probes and biocatalytic activity via in-vitro ligand substitution gave us some promising but not very certain results.

In this report, we will present part of our works in the mechanistic studies in nitrogenase, i.e., synthesis of some special-designed molecular probes whose structures are analogous to homocitric acid (**Scheme 1**).



Scheme 1

The key step of this synthetic route is the Evans aldol reactions between (S)-4-benzyl-3-acetyl-2-oxazolidinone **57** and methyl phenylglyoxylate with various substituent at the para-position. Potassium hexamethyldisilazide (KHMDS) was chosen as the enolate reagent of **57** instead of the commom-used but expensive dibutylboratetetrfluorosulfate (Bu₂BOTf), which resulted in moderate yields and

moderate to good enantioselectivity. After removal of the chiral auxiliary with sodium methoxide and hydrolysis with sodium hydroxide, the various acids analogues to homocitric acid was obtained.

Unfortunately, the aldol reaction did not succeed for dimethyl 2-oxopentanedioate, diethyl 2-oxohexanedioate, and various substituted methyl phenylpyruvate. This prompted us to turn to other synthetic methods in the following works.

Undoubtly, the synthesized analogues of homocitric acid offer us specific chemical probes, which may greatly facilitate us in exploring the roles homocitrate performed and the molecular mechanism of nitrogenase-catalyzed reactions.

Keywords: nitrogenase, analogues of homocitrate, aldol reactions, asymmetric synthesis

目 次

中文摘要

英文摘要

第一章 绪论	1
前期工作及立论依据	2
参考文献	4
第二章 高柠檬酸类似物的不对称合成	6
第一节 文献回顾	6
第二节 逆合成分析	12
第三节 结果与讨论	13
3.1 (S)-4-苄基-3-乙酰基-2-噁唑烷酮(57)的合成	13
3.2 α -氧代羧酸酯的合成	14
3.3 (S)-4-苄基-3-乙酰基-2-噁唑烷酮对 α -氧代羧酸酯的加成	18
3.4 Evans 辅基的脱除及酯的水解	21
第四节 实验部分	23
参考文献	50
第三章 全文小结	55
附录	56
博士后期间发表的论文	71
致谢	72
个人简历及联系地址	73

第一章 绪论

工业氨合成和生物固氮是将惰性的氮气转化为氨的两种基本方法。工业氨合成是一个高耗能、高污染的生产过程，它需要在高温（673-723 K）、高压（100-200 bar）以及铁（或钨等）催化剂存在下才能进行。而生物固氮是指某些自生的、或与某些植物共生的原核微生物利用自身体内的固氮酶在常温常压下将空气中的分子氮还原为氨的过程。与工业氨合成相比，生物固氮具有反应条件温和、不降低土壤性能、不排放环境污染物等优点。

固氮酶由对氧非常敏感的铁蛋白和钼铁蛋白组成（**Figure 1.1**），它包含三个功能金属-硫原子簇： $[4\text{Fe-4S}]$ 簇、P-簇以及FeMoco。在酶促反应中， $[4\text{Fe-4S}]$ 簇的主要功能是负责将电子供体提供的电子传递给钼铁蛋白；P-簇的主要功能是负责接受和储存来自 $[4\text{Fe-4S}]$ 簇的电子并将电子传递给FeMoco；FeMoco是酶促固氮反应的活性中心，它在静止状态下的组成可表示为： Mo-7Fe-9S-X-HCA （ $\text{X} = \text{C}, \text{N or O}$, $\text{HCA} = \text{高柠檬酸}$ ）^[1]。

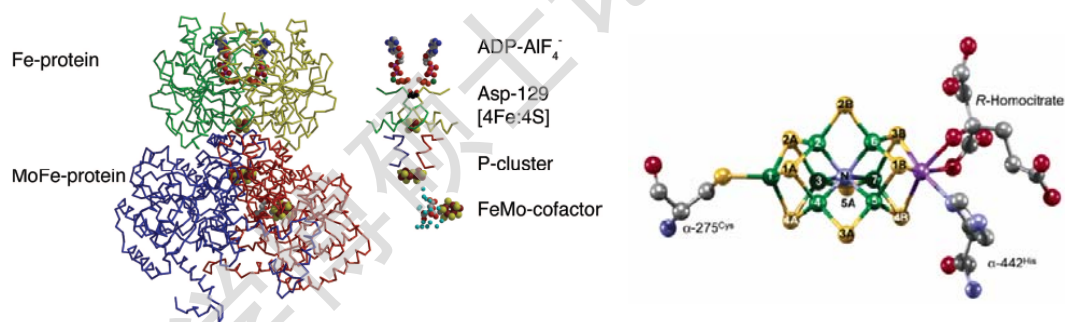


Figure 1.1 Complex of the nitrogenase proteins stabilized by $\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$ (left) and the structure of FeMoco - catalytic active center of nitrogenase (right)

虽然近二十年来随着结构生物学、分子生物学、波谱学和合成化学等基础研究的不断深入以及新技术、新方法的不断应用，固氮酶催化作用分子机理的研究取得了很大进展，但与酶促反应动态相关的一些关键问题，如氮分子与活性中心FeMoco作用的位置和配位活化与反应机理、质子传递途径、固氮酶还原氮分子为什么必须放氢等，至今都还存在着很大的争议^[2]。因此，研究酶促固氮反应的分子机理，对于深化固氮酶（乃至其它含前沿d-轨道的金属酶）催化作用的理论概

念、人工模拟固氮酶和开发高效氨合成催化剂都具有重要的借鉴和指导意义。

前期工作及立论依据

本实验室自上世纪七十年代初开展化学模拟生物固氮以来，在固氮酶活性中心模型、底物的还原和抑制、固氮酶催化作用的机理、化学模拟合成固氮酶金属原子簇等方面都做了很多有意义工作^[3]。我们认为^[3, 4]，固氮酶存在两条氢键链可作为质子传递的载体 (**Figure 1.2**)。

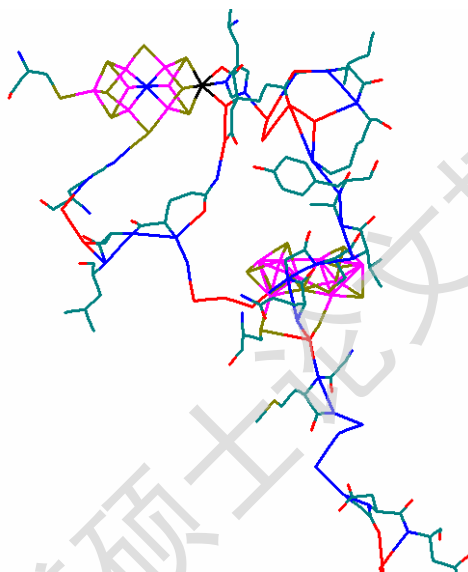
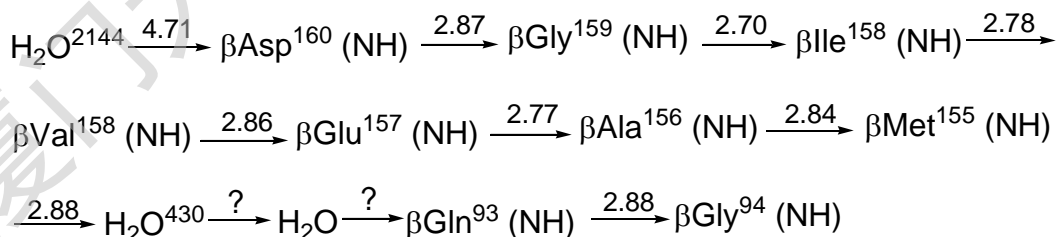


Figure 1.2 Postulated proton transfer pathways of nitrogenase

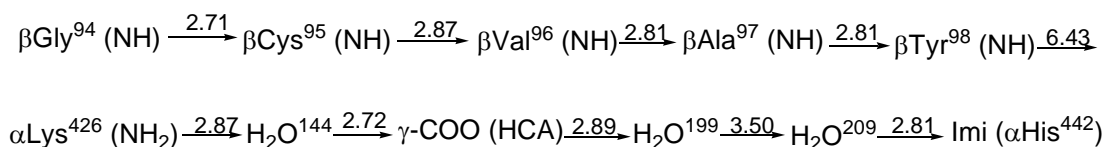
在酶促反应中，ATP水解产生的质子首先从铁蛋白传递至钼铁蛋白嵌合界面的水分子 $\text{H}_2\text{O}^{2144}$ ，然后通过如**Scheme 1.1**所示的氢键链传递至P-簇附近的氨基酸残基 βGly^{94} 。



Scheme 1.1

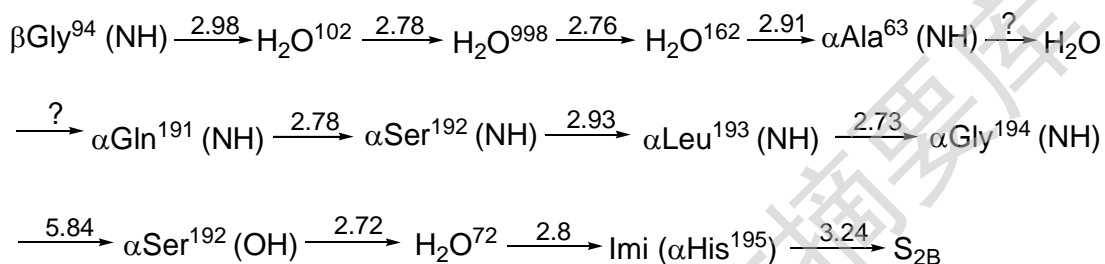
当质子到达 βGly^{94} 之后，它可以通过两条氢键链传递至FeMoco。 **Scheme 1.2**

所示的其中的一条传递通道，它经过HCA- αHis^{442} 到达FeMoco的钼位。



Scheme 1.2

Scheme 1.3 所示的氢键链是质子传递的另一条通道，它通过 αHis^{195} 与FeMoco的 $\text{S}_{2\text{B}}$ 之间的 $\text{NH}\cdots\text{S}$ 氢键进入FeMoco。



Scheme 1.3

我们认为，在酶促反应中，质子首先通过Mo-His⁴⁴²-HCA进入活性中心FeMoco并生成H₂配体，它为N₂分子进入FeMoco起开门作用；当N₂分子进入FeMoco以后，质子就不能通过Mo-His⁴⁴²-HCA进行传递，此时质子转而从 αHis^{195} 进入FeMoco并将N₂还原为NH₃。这种质子传递为N₂进入活性中心开门的假设，我们称之为‘开关机理’，它既可以解释已知的固氮酶还原底物的特性，同时也合理地解释了氮分子还原为什么必须放氢的实验事实。

显然，上述两条质子传递链中的氨基酸残基，如 αHis^{195} 、 αSer^{192} 、 αGln^{191} 、 αLys^{426} 等氨基酸残基的定点突变，或者高柠檬酸被其它有机羧酸替换，都将造成质子传递途径的破坏，并因此导致酶促固氮活性的下降。

为了验证上述质子传递双通道的正确性，我们近期的一个工作主要围绕高柠檬酸的功能进行展开。

高柠檬酸是固氮酶发挥正常功能所不可或缺的有机组分，它通过 β -羟基氧和 β -羧基氧与FeMoco的钼原子配位。但目前有关高柠檬酸在酶促反应中所承担的具体功能和作用方式尚不清楚。

柠檬酸是nifV⁻突变型固氮酶FeMoco的有机组份^[5]，它在结构上仅比高柠檬酸少一个CH₂单元 (**Figure 1.3**)，但柠檬酸固氮酶突变株还原N₂分子的活性却只有野生型固氮酶的 7%，而且还原质子对CO敏感。万等^[6]认为，这是由于高柠檬酸的γ-羧酸根能参与支架一条从P-簇到[Mo]-αHis⁴⁴²的质子传递链，而柠檬酸却没有相同的功能，因此柠檬酸固氮酶突变株还原N₂的活性要比野生型固氮酶下降了一个数量级，并且还原质子对CO敏感。

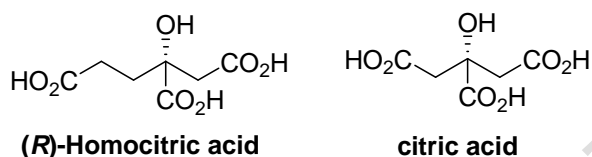


Figure 1.3

分子探针技术是研究固氮酶催化作用分子机理的重要手段之一。在实验上，我们首先合成了外消旋的高柠檬酸和超高柠檬酸作为分子探针^[7]，并采用配体取代的方法研究它们在酶促反应中的生化特性。催化活性测试结果表明^[4]，采用配体取代的方法看来是行不通的。虽然有活性翻倍的数据，但重现性并不高。

鉴于此，我们认为合成手性高柠檬酸及其类似物并采用生物离体合成手段是验证我们提出的质子传递途径的关键。在本文中，我们主要介绍一下我在博士后阶段的一部分工作，即探针分子的合成。

参考文献

- [1] Einsle, O.; Tezcan, F. A.; Andrade, S. L. A.; Schmid, B.; Yoshida, M.; Howard, J. B.; Rees, D. C. Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: A central ligand in the FeMo-cofactor [J]. *Science* **2002**, (297): 1696-1702.
- [2] a) Igarashi, R. Y.; Seefeldt, L. C. Nitrogen fixation: The mechanism of the Mo-dependent nitrogenase [J]. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, (38): 351-384; b) Seefeldt, L. C.; Dance, I. G.; Dean, D. R. Substrate interactions with nitrogenase: Fe versus Mo [J]. *Biochemistry* **2004**, (43): 1401-1409; c) Howard, J. B.; Rees, D. C. How many metals does it take to fix N₂? A mechanistic overview of biological nitrogen fixation [J]. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2007**, 103, 17088-17093.
- [3] Tsai, K. R.; Wan, H. L. On the structure-function relationship of nitrogenase M-cluster and

- P-cluster pairs [J]. *J. Cluster Sci.* **1995**, (6): 485-501.
- [4] 陈洪斌. 厦门大学博士学位论文 [D]. **2007**.
- [5] a) Liang, J.; Madden, M.; Shah, V. K.; Burris, R. H. Citrate substitutes for homocitrate in nitrogenase of a *nifV* mutant of *Klebsiella Pneumoniae* [J]. *Biochemistry* **1990**, (29): 8577-8581;
b) Mayer, S. M.; Gormal, C. A.; Smith, B. E.; Lawson, D. M. Crystallographic analysis of the MoFe protein of nitrogenase from a *nifV* mutant of *Klebsiella pneumoniae* identifies citrate as a ligand to the molybdenum of iron molybdenum cofactor (FeMoco) [J]. *J. Biol. Chem.* **2002**, (277): 35263-35266.
- [6] 万惠霖, 黄静伟, 张凤章, 周朝晖, 张鸿图, 许良树, 蔡启瑞. 化学探针方法研究固氮酶 M-簇和P-簇对的结构与功能关系 [J]. *厦门大学学报(自然科学版)* **1996**, (35): 890-899.
- [7] Chen, H. B.; Chen, L. Y.; Huang, P. Q.; Zhang, H. K.; Zhou, Z. H.; Tsai, K. R. Expedient biomimetically-inspired approaches to racemic homocitric acid lactone and per-homocitrate [J]. *Tetrahedron* **2007**, (63):2148-2152.

第二章 高柠檬酸及其同系物的合成

高柠檬酸是固氮基因 $nifV$ 或高柠檬酸合酶催化乙酰辅酶A与 α -氧代戊二酸缩合的产物^[1]。由于这种酶促合成的方法一次所能获得的量一般在几百毫克以内^[2]，因此高柠檬酸的价格十分昂贵 (≥ 1000 美元/克)。更为关键的是，我们在进行固氮酶质子传递机理研究时所需要的高柠檬酸类似物至今仍未见文献报道。因此，我们的首要任务就是展开化学合成。

第一节 文献回顾

迄今为止已有不少有关高柠檬酸的化学合成见于文献报道。1966 年Thomas等^[3]以天然的左旋奎尼酸 **2** 为原料，首次合成了(*S*)-高柠檬酸内酯 (**Figure 2.1**)。该路线首先通过催化氧化和催化氢化两步反应将原料 **2** 转化为关键中间体(1*S*, 3*R*, 4*R*)-1, 3, 4-三羟基环己基甲酸 **4**，然后通过氧化断裂化合物 **4** 的偕二醇官能团为两个羧酸官能团，从而得到目标分子(*S*)-**1**。

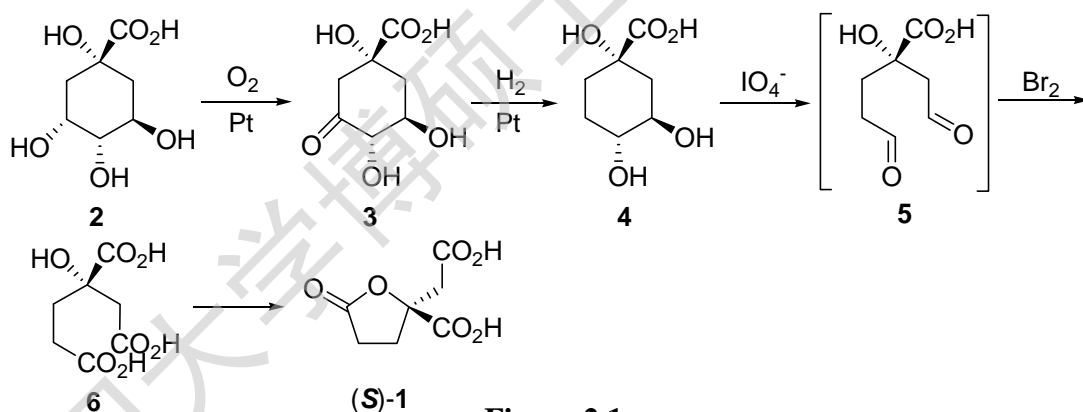


Figure 2.1

1996 年，Rodriguez和Biellmann^[4]首次报道了不对称合成(*R*)-及(*S*)-高柠檬酸内酯的方法 (**Figure 2.2**)。作者以便宜、易得的L-乳酸 **7** 和L-丝氨酸 **8** 为原料，通过立体中心自身再生原理 (SRS) 得到关键的手性中间体化合物 **9**。随后通过高立体选择性的Diels-Alder环加成、臭氧化-氧化、脱保护等反应，最终得到目标分子(*R*)-**1** 和(*S*)-**1**，反应的总收率为 3.0%。

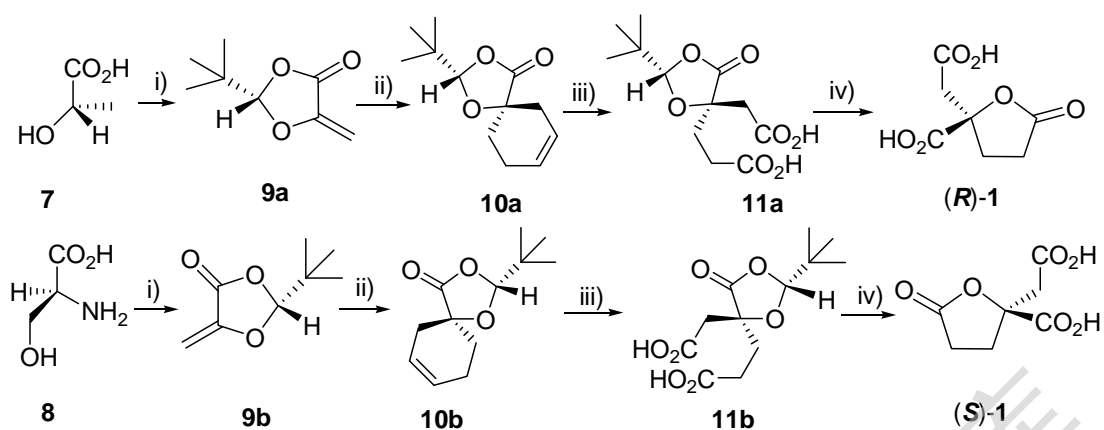


Figure 2.2

Reagents and conditions: (i) pivaldehyde, pentane, p-Toluenesulfonic acid (cat.); (ii) butadiene, toluene; (iii) (a) ozone, MeOH, -78°C ; (b) H_2O_2 ; (iv) (a) 80% HCO_2H , reflux, 2h; (b) $\text{Me}_3\text{SiCHN}_2$; (c) 0.2 N NaOH, reflux, 6 h; then 1 N HCl

1997 年, Ancliff 等^[5]报道了一条基于动力学拆分合成(R)-高柠檬酸内酯的路线 (Figure 2.3)。作者以柠檬酸 12 为原料, 经三步反应得到外消旋的化合物 15, 接着通过(S)- α -苯乙胺进行动力学拆分, 以 20%的产率得到光学活性中间体 16 ($ee \geq 90\%$)。随后经过Arndt-Einstert反应和Wolff重排等多步反应, 即得到目标分子(R)-1。反应的总收率为 5.6%。

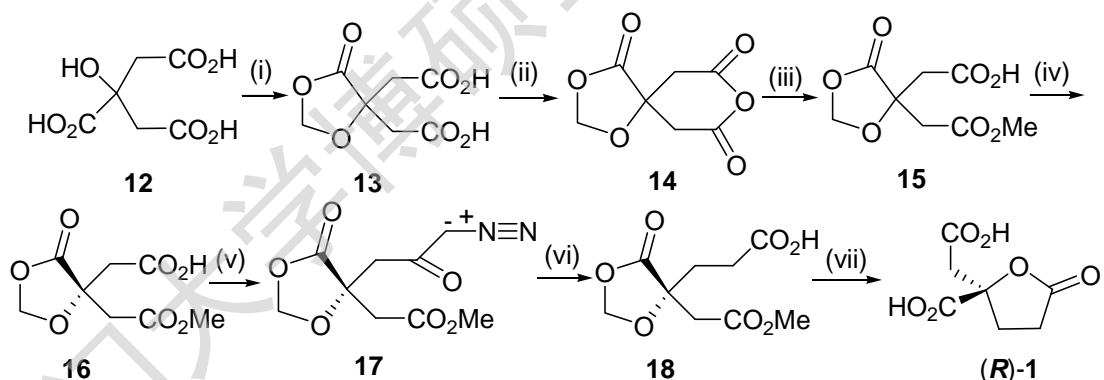


Figure 2.3

Reagents and conditions: i) 3 equiv. $(\text{CH}_2\text{O})_n/\text{DMSO}$, 156°C ; ii) $\text{POCl}_3/\text{PhNMe}_2/\text{CHCl}_3$, rt; iii) MeOH, reflux; iv) α -methylbenzylamine, MeOH; then 2N HCl; v) (a) $(\text{COCl})_2$, rt, 72h; (b) CH_2N_2 , Et_2O ; vi) AgNO_3 , $\text{THF-H}_2\text{O}$, rt, 36h; vii) 80% HCO_2H , reflux 72h.

2000 年, Ma和Palmer^[6]报道了另一条基于SRS原理合成(R)-高柠檬酸的路线 (Figure 2.4)。原料D-苹果酸首先用特戊醛进行保护, 得到(R,R)-构型的缩醛化

合物 **19**，而后通过高立体选择性烯丙基烷基化、硼氢化-氧化、去保护、皂化等官能团转化，最终得到高柠檬酸三钠盐 **22**。反应的总收率为 12.0%。

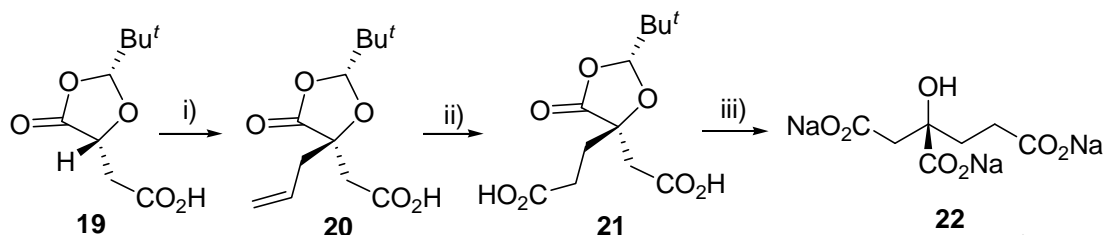


Figure 2.4

Reagents and conditions: i) 2 equiv. LiHMDS/THF, -78 °C; then Allyl bromide; ii) (a) AcCl, reflux 1h; then MeOH, reflux 4h; (b) $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2 / \text{CH}_2\text{Cl}_2$, 25 °C, 4h; (c) PDC/DMF, 25 °C, 16h; iii) (a) 50% trifluoroacetic acid, 95 °C, 2h; (b) 3% NaOH, 1 equiv., 25 °C, 2h.

Xu等^[7]对上述方法做了改进, 采用碘代丙酸乙酯作为反应的亲电试剂, 实现了(*R*)-高柠檬酸内酯的简洁合成 (Figure 2.5), 反应的总收率达 32%。

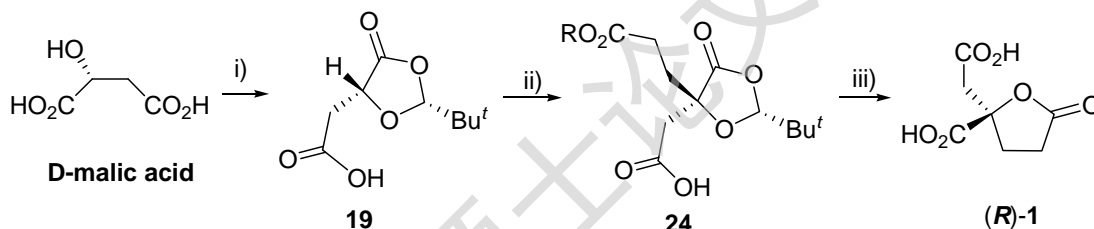


Figure 2.5

Reagents and conditions: i) pivaldehyde, H_2SO_4 , p-TsOH (cat.), pentane, reflux; ii) (a) 2 equiv. LiHMDS/THF, -78 °C; (b) $\text{ICH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$; (c) 1.5 N HCl; iii) 50% trifluoroacetic acid, 95 °C, 2h.

2004 年, Paju等^[8]以螺环化合物 **25** 为原料, 经简短的步骤合成了(*R*)-高柠檬酸内酯 (Figure 2.6)。作者首先试图在碱性条件下将 **25** 水解开环得到化合物 **26**, 然后通过氧化反应得到高柠檬酸内酯 (路径a)。但在实际反应中, **25** 开环得到的产物是化合物 **26** 和 **27** 的混合物。为此作者直接将 **25** 在碱性条件下氧化, 然后通过酸化即得到(*R*)-高柠檬酸内酯 (路线b), 反应的高达总收率 74%。

但必须指出, 螺环化合物 **25** 的制备过程比较繁琐^[9], 这极大地限制了该路线的实际使用价值。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库